

(19)



JAPANESE PATENT OFFICE

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **07033789 A**(43) Date of publication of application: **03.02.95**

(51) Int. Cl.

C07F 9/12
G01N 21/75
// C12Q 1/42

(21) Application number: **03133815**(22) Date of filing: **29.03.91**(62) Division of application: **56044325**(71) Applicant: **FUJI PHOTO FILM CO LTD**

(72) Inventor: **INAGAKI YOSHIO**
OKAZAKI MASAKI

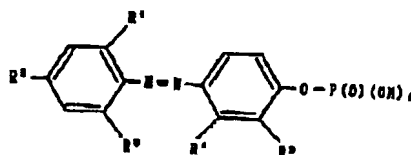
(54) PHOSPHORIC ESTER

(57) Abstract:

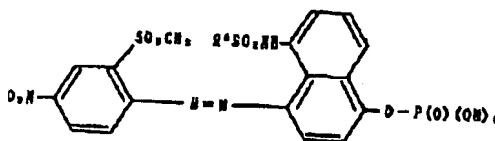
PURPOSE: To obtain a phosphoric ester of a specific structural formula, useful as a substrate for determining an alkali phosphatase, having excellent handleability during measurement, hardly being obstructed with colored substances in blood, having excellent detection sensitivity.

CONSTITUTION: An ester of formula I or formula II (M is H, Na or K; one of R¹ and R² is methylsulfonyl and other is nitro; R³ is Cl or H; R⁴ is H, hydroxyl, methyl or methylcarbonylamino; R⁵ is H or Cl; R⁶ is methyl or 3-sulfamoylphenyl). In the synthesis, for example, an azo coloring matter obtained from an aromatic amine and a phenol derivative is reacted with phosphorus oxychloride in the presence of pyridine and further with water and the prepared phosphoric monoester is dissolved in NaOH, etc., dripped into ethanol under stirring to obtain the objective compound as crystals.

COPYRIGHT: (C)1995,JPO



I



II

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-33789

(43) 公開日 平成7年(1995)2月3日

(51) Int.Cl.⁸

C 0 7 F 9/12

G 0 1 N 21/75

// C 1 2 Q 1/42

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

9155-4H

A 9408-2 J

6807-4B

審査請求 有 発明の数 1 書面 (全 12 頁)

(21) 出願番号

特願平3-133815

(62) 分割の表示

特願昭56-44325の分割

(22) 出願日

昭和56年(1981)3月26日

(71) 出願人 000005201

富士写真フイルム株式会社

神奈川県南足柄市中沼210番地

(72) 発明者 稲垣 由夫

神奈川県南足柄市中沼210番地 富士写真

フイルム株式会社内

(72) 発明者 岡崎 正樹

神奈川県南足柄市中沼210番地 富士写真

フイルム株式会社内

(74) 代理人 弁理士 中村 稔 (外5名)

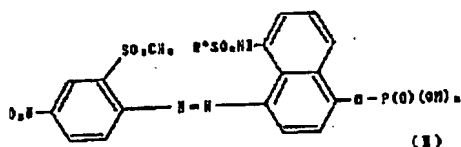
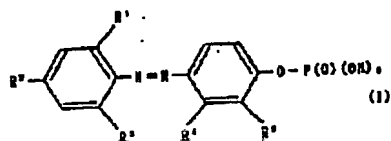
(54) 【発明の名称】 リン酸エステル

(57) 【要約】

【目的】 アルカリ性ホスファターゼ定量用基質として用いる新規化合物であって、測定の際の操作性に優れかつ血中の色素等の有色物による妨害を受け難く、検出感度も優れ、しかも合成および精製に難点のない新規化合物を提供する。

【構成】

【化8】



(式中、Mは水素原子、ナトリウム原子またはカリウム原子であり、R¹とR²の一方はメチルスルホニル基、

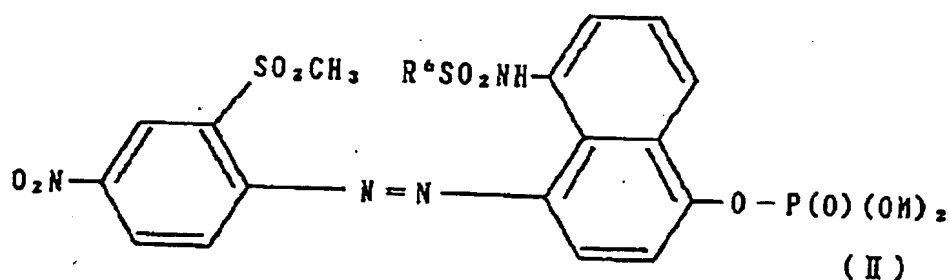
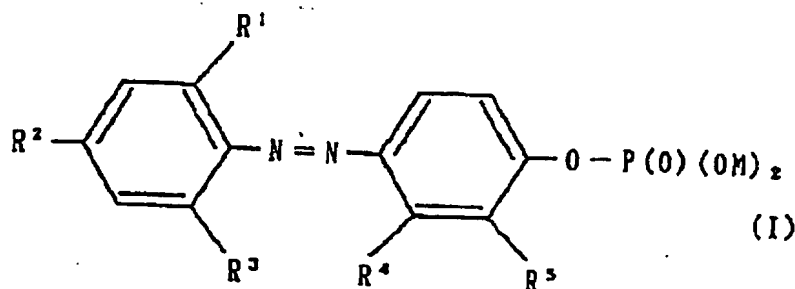
R¹とR²の他方はニトロ基であり、R³は塩素原子または水素原子、R⁴は水素原子、ヒドロキシル基、メチル基またはメチルカルボニルアミノ基であり、R⁵は水素原子または塩素原子であり、R⁶はメチル基または3-スルファモイルフェニル基である。)

【特許請求の範囲】

【請求項1】 一般式 (I) または (II) で表される

リン酸エステル。

【化1】



(式中、Mは水素原子、ナトリウム原子またはカリウム原子であり、R¹とR²の一方はメチルスルホニル基、R¹とR²の他方はニトロ基であり、R³は塩素原子または水素原子、R⁴は水素原子、ヒドロキシル基、メチル基またはメチルカルボニルアミノ基であり、R⁵は水素原子または塩素原子であり、R⁶はメチル基または3-スルファモイルフェニル基である。)

【発明の詳細な説明】

【産業上の利用分野】本発明は新規なリン酸モノエステルに関するものである。さらに詳しくは、アルカリ性ホスファターゼの作用により加水分解されてアゾ色素を放出する新規なモノ-4-アリールアゾアリールリン酸エステルに関するものである。

【従来の技術】人の体液中のアルカリ性ホスファターゼの活性を知ることは臨床検査上極めて重要である。すなわち、一般にアルカリ性ホスファターゼの活性が高い時は、肝臓、骨等の新陳代謝が不順な状態にあり、肝臓病、くる病、骨肉腫、甲状腺異常などの症状が現われることはよく知られている。従ってアルカリ性ホスファターゼの活性を測定するための種々の方法が考え出されていることは極めて当然なことである。日常の臨床検査におけるアルカリ性ホスファターゼ定量法としては操作が簡単でしかも再現性の良いことが必要であるが、この目的にはいわゆる比色法とケイ光法とがある。すなわち、比色法とは、アルカリ性ホスファターゼの作用によって加水分解されて色素あるいは色素の前駆体を放出する化合物を酵素反応の基質として用い、酵素反応の結果放出される色素を比色定量することにより、あるいは酵素反応の結果放出される色素前駆体を、試薬を加えて化学反

応させて色素に変え、その色素を比色定量することによりアルカリ性ホスファターゼの活性度を知る方法であり、広く普及している比色計あるいは分光光度計を用いて定量できるという利点がある。一方ケイ光法とは、アルカリ性ホスファターゼの作用によって加水分解されて、発ケイ光物質を放出する化合物を酵素反応の基質として用い、酵素反応の結果放出される発ケイ光物質のケイ光強度を測定することによりアルカリ性ホスファターゼの活性度を知る方法であり、比色法に比べて感度が高いが微量の共存する発ケイ光物質による妨害を受けやすいことおよびケイ光光度計があまり普及していないという難点がある。本発明は比色法によるアルカリ性ホスファターゼの定量法において好適な基質となる新規化合物モノ-4-アリールアゾアリールリン酸エステルに関するものである。従来、比色法によるアルカリ性ホスファターゼの定量法として次の方法が用いられていた。

(1) p-ニトロフェニルリン酸二ナトリウムを基質として用い、アルカリ性ホスファターゼの作用による加水分解の結果放出されるp-ニトロフェノールを比色定量する方法であり、具体的方法についてはO. A. Bessy, O. H. Lowry, およびM. J. Brock著、Journal of Biological Chemistry誌 第164巻、321頁(1946年発行)に記載されている。

(2) リン酸フェノールフタレインを基質として用い、アルカリ性ホスファターゼの作用による加水分解の結果放出されるフェノールフタレインを比色定量する方法であり、具体的にはA. L. Babson, S. J. Greeley, C. M. Coleman, およびG.

E. Phillips 著、Clinical Chemistry 誌、第12巻、482頁（1966年発行）に記載されている。

(3) リン酸チモールフタレインを基質として用い、アルカリ性ホスファターゼの作用による加水分解の結果放出されるチモールフタレインを比色定量する方法であり、具体例はC. M. Colemann Clinical Chemistry 誌、第13巻、401頁（1966年発行）に記載されている。

(4) チモールブルーモノホスフェイトを基質として用い、アルカリ性ホスファターゼの作用による加水分解の結果放出されるチモールブルーを比色定量する方法であり、具体例は特開昭51-136662号に記載されている。

(5) フェニルリン酸を基質として用い、アルカリ性ホスファターゼの作用による加水分解の結果放出されるフェノールを、赤血塩の存在下で4-アミノアンチピリンと酸化縮合させ、生じた赤色キノンを比色定量する方法で、具体例としては、P. R. N. Kind, および E. J. King 著、Clinical Pathology 誌、第7巻、322頁（1954年発行）；渡辺賢誠ほか著、「臨床病理」誌、第15巻、708頁（1967年発行）中山年正ほか著「臨床病理」誌、第23巻（総会補冊）85頁（1975年発行）に記載されている。

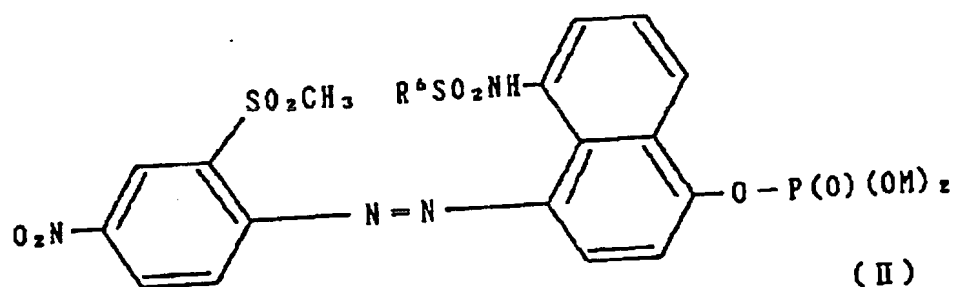
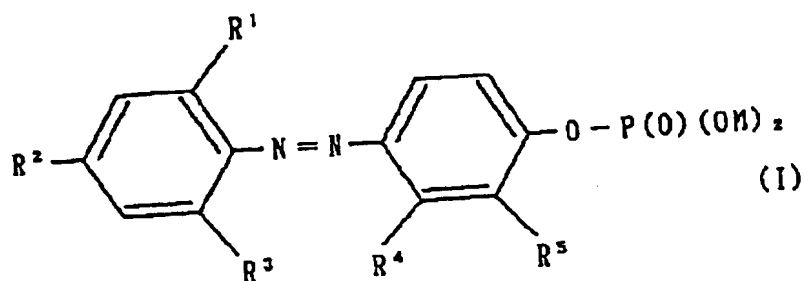
以上に述べた従来法のうち(1)の方法はアルカリ性ホスファターゼの定量法として最も広く用いられているが、比色波長が410nmであるため血清中のビリルビンやヘモグロビンなどの有色物による妨害を免れず、検体盲検が必要となり、それだけ操作が繁雑になる欠点があった。従来法(2)～(5)の方法においては、比色波長がさらに長波領域にあるためこの欠点は一応克服さ

れている。しかしながら、フタレイン類のモノリン酸エステルを基質とする(2)、(3)および(4)の方法においては純度の高い基質を合成することが難しい。つまり、これらのモノリン酸エステルは対応するフタレインを分子中の1個の水酸基をオキシ塩化リンと反応させて得られるフタレインのモノホスホロジクロリデートを加水分解して合成するが、フタレインに対するオキシ塩化リンの量が多いとフタレイン分子中の2個の水酸基がホスホリル化されてしまい、またフタレインに対するオキシ塩化リンの量が少ないとオキシ塩化リン1分子に対してフタレインが2分子あるいは3分子反応するので生成物が2種あるいは3種も生成してしまう。いずれの場合にもアルカリ性ホスファターゼの定量用基質として不適当な化合物が副生する。したがって反応後の単離精製が繁雑になり、純度の高い生成物を多く手に入れることが困難であった。一方、従来法(5)の方法においてはフェノールを遊離させる酵素反応と発色反応との2段階の反応過程を経ることが必要であるため操作もそれだけ繁雑であった。このため以上のような欠点のないアルカリ性ホスファターゼ定量法の出現が望まれていた。

【発明が解決しようとする課題】したがって、本発明の目的は測定の際の操作性に優れ、かつ血中の色素等の有色物による妨害を受け難く、検出感度も優れ、しかも合成および精製に難点がないアルカリ性ホスファターゼ定量用基質として有用な新規化合物を提供することである。

【課題を解決するための手段】上記の目的は、下記的一般式(I)または(II)で示される新規なモノ-4-アリアルアゾアリアルリン酸エステルによって効果的に達成され得ることを見出した。

【化2】

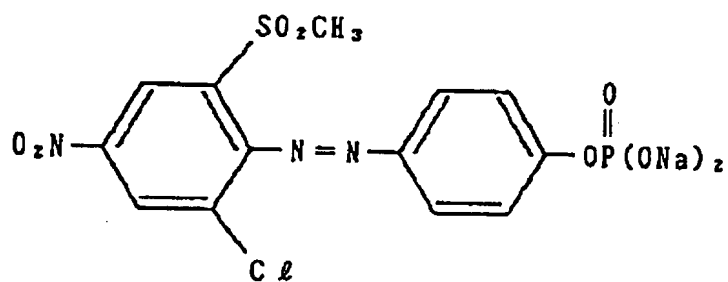


(式中、Mは水素原子、ナトリウム原子またはカリウム原子であり、R¹とR²の一方はメチルスルホニル基、R¹とR²の他方はニトロ基であり、R³は塩素原子または水素原子、R⁴は水素原子、ヒドロキシル基、メチル基またはメチルカルボニルアミノ基であり、R⁵は水素原子または塩素原子であり、R⁶はメチル基または3-スルファモイルフェニル基である。)一般式(I)または(II)で表わされる化合物はいずれもアルカリ性ホスファターゼの作用によってアルカリ性ホスファターゼの活性に比例した速度で加水分解されて対応するアゾ

色素を放出するため、アルカリ性ホスファターゼの定量用基質として用いることができる。特に一般式(I)においてR⁴及びR⁵が水素原子である化合物は、原料入手し易く、また、酵素反応の結果放出される色素の可視吸収スペクトルの吸収極大波長が大きくしかも分子吸光係数が大きいので好ましい。次に、上記一般式(I)または(II)で表わされる化合物の具体例を示すが、本発明の範囲はこれらの化合物のみに限定されるものではない。

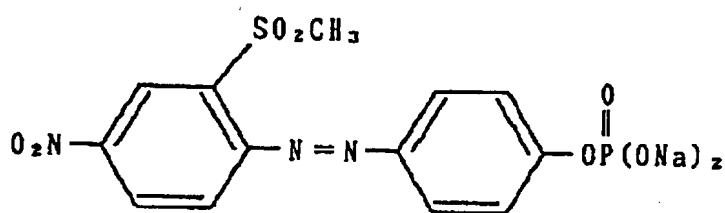
【化3】

化合物 1 :



化合物 2 : 化合物 1 において Na のかわりに K
となった化合物

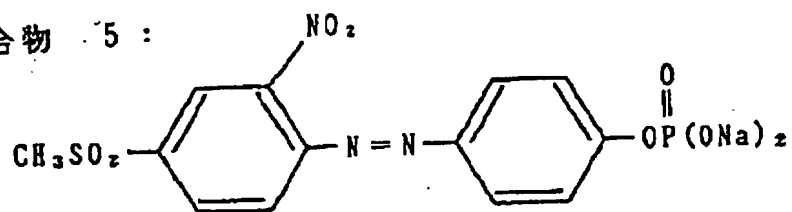
化合物 3 :



化合物 4 : 化合物 3 において Na のかわりに K
となった化合物

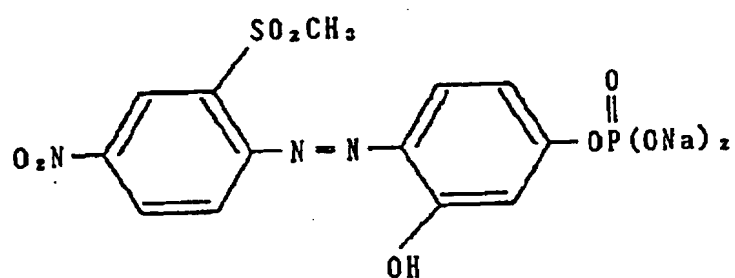
【化4】

化合物 5 :

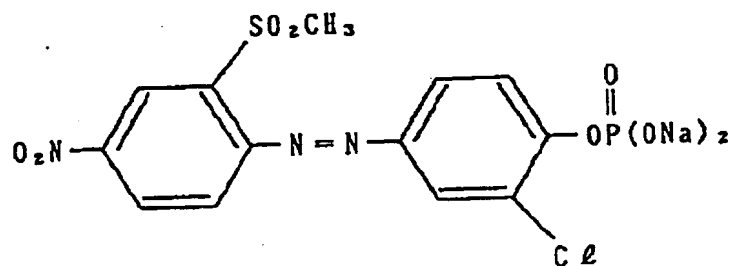


化合物 6 : 化合物 5 において Na のかわりに K
 となった化合物

化合物 7 :

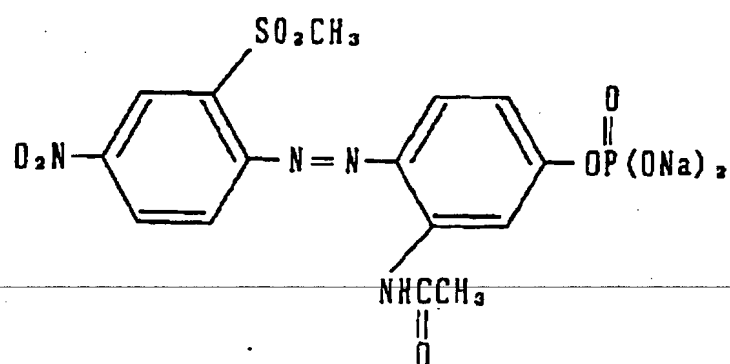


化合物 8 :

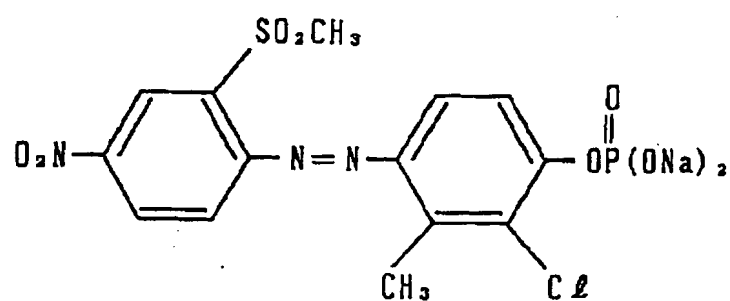


【化5】

化合物 9 :

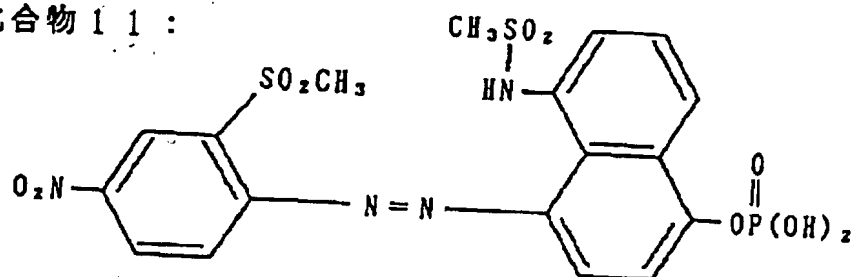


化合物 10 :

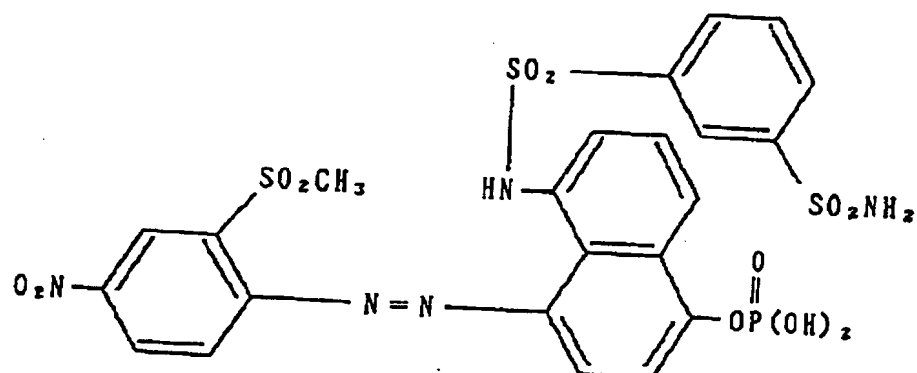


【化6】

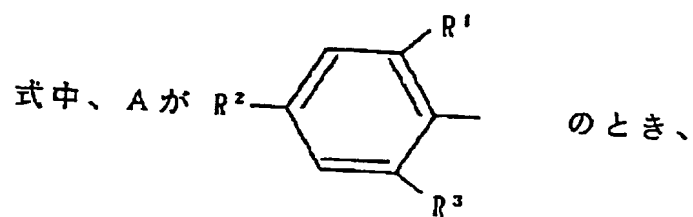
化合物 1 1 :

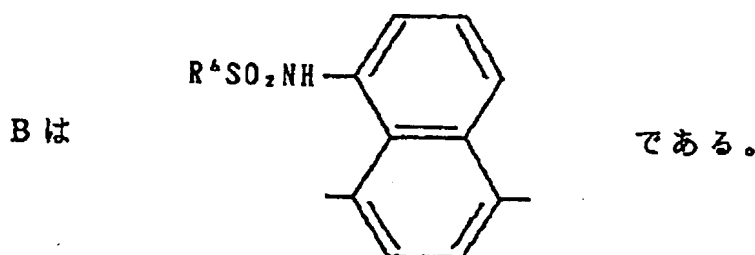
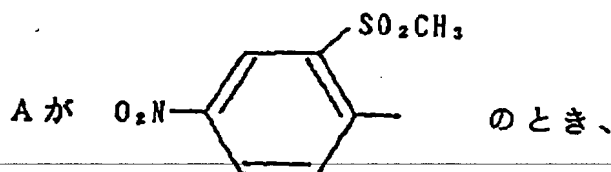
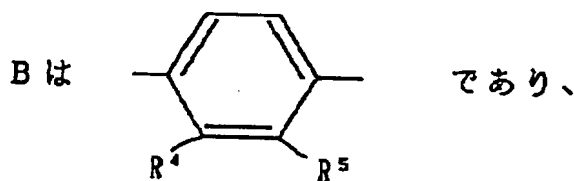


化合物 1 2 :



次に、上記一般式 (I) または (II) で表わされる化合物の合成法について述べる。ここで反応



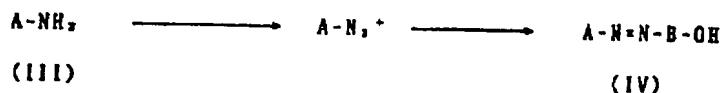


まず、芳香族アミンA-NH₂ (III) とフェノール誘導体H-B-OHとを常法によりジアゾカップリングさせてアゾ色素(A-N=N-B-OH) (IV) を合成する。なお、Aに強い電子吸引性基であるメチルスルホニル基とニトロ基が存在するため、ジアゾ化によって生じるジアゾニウム塩を合成するにあたってはいわゆる

ジアゾ化

ニトロシル硫酸法(たとえばS. R. SandlerおよびW. Karo著「Organic Functional Group Preparations」第2巻、295頁(1971年 Academic Press発行)に具体例が記載されている。)を用いることが好ましい。

H-B-OH

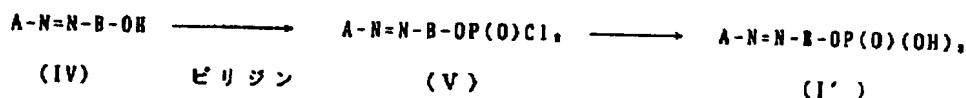


次いでピリジンの存在下にアゾ色素(IV)を大過剰のオキシ塩化リンと反応させてホスホロジクロリデート

POCl₃

(V)とした後、(V)を水と反応させてリン酸モノエステル(I')とする。

H₂O



(IV)より(V)を得る反応においては、(IV)の3倍モル以上、好ましくは3倍ないし10倍モルのオキシ塩化リンをアセトン、トリメチルリン酸あるいはアセトンとトリメチルリン酸との混合溶媒にて2ないし50倍、好ましくは5~10倍に希釈した溶液に-15℃ないし10℃、好ましくは-10℃ないし0℃で、(IV)をピリジン、ピリジンを含むアセトン、ピリジンを含むトリメチルリン酸、あるいはピリジンを含むアセトンとトリメチルリン酸との混合溶媒に溶かした溶液を滴下することにより、ほとんど副生成物が生じることなく(IV)を(V)へ変換することができるを見出した。なお、ピリジンの代わりに、トリエチルアミン等のピリジンより塩基性の強い3級アミンを(IV)の溶液に加えてもさしつかえない。(V)の生成はシリカゲル薄

層クロマトグラフィーにおいて(IV)よりもR_f値の小さいスポットが出現することによって確認できる。従来たとえばp-ニトロフェニルホスホロジクロリデートのごときアリールホスホロジクロリデートはオキシ塩化リンとフェノールとを塩化カリウムなどの存在下に加熱還流することにより合成されていた。その具体例は、たとえば向山および橋本著、Bulletin of the Chemical Society of Japan誌、第44巻、196頁(1971年発行)に記載されている。しかしこのような激しい条件下では、上記化合物(V)は効率よく生成しなかった。(V)を

(I')へ変換する際には、(V)を単離せずに反応液に水を加えればよい。ただし酸性条件下では(I')が分解することがあるから(V)と水との反応に際しては

発生する塩化水素を捕捉し得るピリジン等の三級アミンを加えるか酢酸エチルなどの水に不溶な溶媒を共存させて水-油の2層系とすることによって好ましい結果が得られることがある。こうして得た(I')に濃い水酸化ナトリウムあるいは水酸化カリウムの水溶液を加えて溶

NaOHまたはKOH



(I')

こうして得た化合物(I)または(II)を少量の水に溶かした後、エタノール中に注入して晶析することにより精製を行なうことができる。なお、この方法によって得た結晶には、1分子あたり数分子の結晶水を含むことが多い。以上のようにして合成した上記一般式(I)または(II)で表わされる本発明の化合物はアルカリ性ホスファターゼ定量用基質として優れている。すなわち上記一般式(I)または(II)で表わされる化合物は、(1)アルカリ性ホスファターゼの作用によって、アルカリ性ホスファターゼの活性度に比例した速度で加水分解されてアゾフェノール色素を与え、(2)これらの色素は、従来広く行なわれてきたp-ニトロフェニルリン酸二ナトリウムを基質として用いる方法における呈色色素であるp-ニトロフェノールよりも長波長側に可視光吸収極大を有するので、それだけ血中色素等の有色物質による妨害を受け難く、(3)かつこれらの色素は水溶性であるため、酵素活性測定中に凝集や沈澱を起こすことがなく、したがってアルカリ性ホスファターゼ定量用基質として使用した場合、定量試験条件設定の自由度が高く、(4)しかも合成例に示す通り合成に難点がなく、本明細書の冒頭に述べたとおりリン酸フタレイン、リン酸チモールフタレイン、あるいはチモールブルーモノホスフェイトの合成においては化合物の単離精製操作が繁雑であるのとは対照的に、通常の晶析によって精製できる。本発明の化合物を用いてアルカリ性ホスファターゼを定量するには、Bessey-Lowry法(Journal of Biological Chemistry誌、第164巻、321頁、1946年発行に記載されている。)におけるp-ニトロフェニルリン酸二ナトリウムのかわりに本発明の化合物を用い、Bessey-Lowry法において酵素反応の結果生じるp-ニトロフェノールの量を求めるかわりに本発明の化合物から生じるアゾ色素A-N=N-B-OHの量を求めればよい。例えば、まず、一般式(I)または(II)にて示される化合物をpH10前後の緩衝液に溶解し基質液を調製する。このとき、基質液に、酵素活性剤(例えば塩化マグネシウム)などを添加すると好ましい。次に、この基質液に、被測定物であるアルカリ性ホスファターゼを含有する液を添加し反応を行なわせる。このとき、一般式(I)または(II)で示される化合物は、基質液中に1~20ミリモル/リットルの

解しpHを約10に調節した後不溶部を濾去して得た溶液をその約10~20倍容のエタノール中に攪拌しつつ滴下することによって(I)または(II)の結晶を得ることができる。



(I) または(II)

濃度で存在しているのが好ましい。また、一般式(I)または(II)で示される化合物は、アルカリ性ホスファターゼに対して、大過剰に、すなわちモル比では10倍以上存在していることが好ましい。上記反応は、10~50℃より好ましくは30~40℃の温度にて、10~60分間の時間にて行なわれる。次に、必要に応じて、溶液のpHを塩基または酸を添加して上げたり、下げたり、場合によっては、DMF(ジメチルホルムアミド)、メチルセロソルブ等の有機溶剤を添加してこの反応を停止させこのときの生成したアゾ色素の濃度を分光光度計などによって濃度測定することによって、必要により、検量線からアルカリ性ホスファターゼを定量する。比色波長は当該色素の吸収極大波長付近に設定すればよいが、比色の際にシクロデキストリン類好ましくはα-シクロデキストリンを添加することにより吸収極大波長を長波長側へシフトさせることも可能である。このとき、シクロデキストリン類の添加量は、比色液1ml当たり0.1mgないし20mg、好ましくは1mgないし10mgである。次に、本発明の一般式(I)または(II)で表わされる化合物のうち化合物3について合成例を示す。化合物3以外のものについても前述の合成法に基づき、また下記の記載に順じて容易に合成することができる。

合成例：化合物3の合成

オキシ塩化リン4mlとアセトン20mlとを混合し-8℃に冷却した。この溶液に、4-(2-メタンシルホニル-4-ニトロフェニルアゾ)フェノール2gをアセトン20ml、トリメチルリン酸10ml、ピリジン8ml、およびトリエチルアミン0.5mlに溶かした溶液を25分間にわたって滴下した。この間、反応液の温度が0℃を越えぬように外部から冷却した。さらに30分間0℃以下で攪拌を続けた後、30mlの水を滴下した。室温で10分間攪拌した後、200mlの飽和食塩水と氷との混合物中に注入し、生じた結晶を濾取した。この結晶に1規定の水酸化ナトリウム水溶液20mlを加えpHを約10とした。不溶部を濾却した後、濾液をエタノール150ml中に注入し、生じた結晶を濾取しエタノールで洗浄し、減圧下に乾燥した。収量2g、λ_{max} 0.02N-NaOH 382nm
次に、本発明の化合物を用いてアルカリ性ホスファターゼを定量する方法の具体例を示す。

参考例 1.

基質液の調製：化合物3の結晶35.05mgを10mlのグリシン緩衝液(pH10、0.5mmole/リットルの塩化マグネシウムを含む)に溶かした。

酵素液の調製：シグマケミカル社アルカリ性ホスファターゼType I約6mgを20mlの蒸留水に溶かした液および、この液を2倍および4倍に希釈した液を3種類調製した。

操作：基質液1mlを試験管に入れ37℃に3分間加温した。酵素液0.1mlを加え、37℃で30分間加温し反応させた後0.02規定の水酸化ナトリウム水溶液10mlを加えて反応を停止した。酵素液のかわりに蒸留水を用いる点を除いて全く同様に処理した盲検液を対照として520nmで吸光度(ΔOD)を測定した。このようにして、濃度の異なった3種類の酵素液について各々測定を行なった。これらと同じ酵素液についてBessey-Lowry法を適用した場合の410nmにおける盲検液を対照とした吸光度(ΔOD)を測定した。

なおBessey-Lowry法の操作は上記化合物3の結晶35.05mgのかわりにp-ニトロフェニルリン酸ナトリウム20mgを用いて410nmで比色する他は上記の操作と全く同様である。これら2つの方法による ΔOD の値の関係を図1に示した。この図1から次のことが明らかとなった。

(1) 酵素濃度に比例して、すなわちBessey-Lowry法による値に比例して ΔOD が変化するので ΔOD の値から酵素の活性を求めることができる。

(2) 化合物3を基質とした場合の ΔOD はBessey-Lowry法の ΔOD より大きな割合で変化しているので(直線の勾配が1以上)、化合物3を基質とした場合のほうがBessey-Lowry法より感度が

高い。

(3) 化合物3を基質とした場合には520nmで比色できるので、410nmで比色するBessey-Lowry法より、血中の色素などの有色物質による妨害を受け難い。

このように本発明の化合物は、アルカリ性ホスファターゼの定量用基質として好適な化合物であることがわかる。

参考例2. 参考例1の化合物3の結晶35.05mgのかわりに48.18mgの化合物12の結晶を用い、吸光度の測定を520nmではなく644nmで行なう他は参考例1と同様の操作を行なった。結果を図2に示した。この図2から次のことが明らかである。

(1) 酵素濃度に比例して、すなわちBessey-Lowry法による値に比例して ΔOD が変化するので ΔOD の値から酵素の活性を求めることができる。

(2) 化合物12を基質とした場合には、644nmで比色できるので、410nmで比色するBessey-Lowry法より血中の色素などの有色物質に妨害を受け難い。

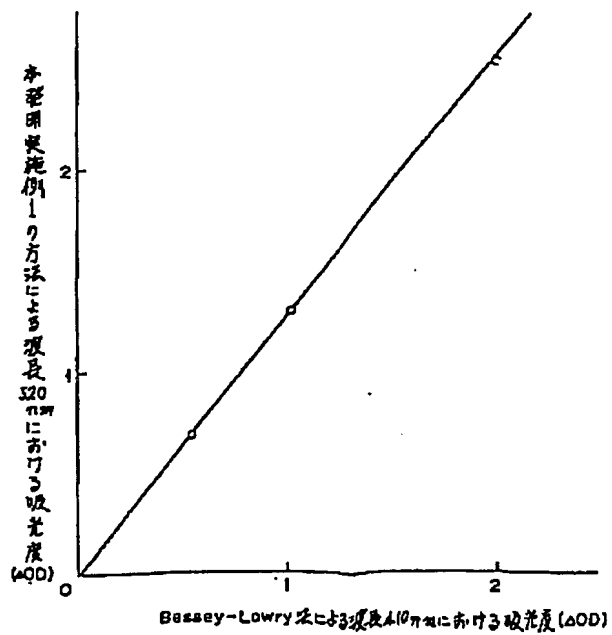
このように本発明の化合物は、アルカリ性ホスファターゼの定量用基質として好適な化合物であることがわかる。

【図面の簡単な説明】

【図1】化合物3を用いてアルカリ性ホスファターゼを測定したときの結果を示すグラフである。

【図2】化合物12を用いてアルカリ性ホスファターゼを測定したときの結果を示すグラフである。図1および図2において、横軸はBessey-Lowry法を用いた場合の吸光度(ΔOD)であり縦軸は本発明の化合物を基質として用いた場合の吸光度(ΔOD)である。

【図1】



【図2】

